

論文内容の要旨

論文題目

Studies on mammalian sperm fertility and its regulation by seminal plasma

(精漿による哺乳類精子受精能の制御機構に関する研究)

氏名 河野 菜摘子

一般的に哺乳類精子は射精された直後は卵子へ侵入することができない。しかし雌の生殖道内を通過することによって精子は先体反応を誘起し卵子へと侵入可能となる。この現象は精子の受精能獲得(capacitation)と呼ばれている。一方、体外受精などの *in vitro* の実験によって、多くの動物種の精漿中には精子の受精能獲得を抑制する作用(decapacitation)が種を問わず存在することが知られている。この現象は *in vivo* においては卵へ到達するまでの長い時間および距離の間に精子の受精能を低く保つ作用があると考えられている。これまで多くの研究者により decapacitation factor を同定する試みがなされてきたが、種間に共通する因子は未だ同定されておらず、実際に decapacitation を *in vivo* において観察した報告例もない。

また、多くの哺乳類に共通して見られる現象に精液の凝固がある。精液の凝固は副生殖腺の一つである精囊から分泌されるタンパク質によって引き起こされていることが知られており、この精液凝固タンパク質ファミリーは霊長類をはじめとした多くの動物において確認されている。近年、ヒトの精液凝固タンパク質 semenogelin (SEMG)が精子の capacitation および運動を抑制する作用があると報告されたことから、他の動物種においても精液凝固タンパク質が decapacitation factor として働く可能性が考えられる。そこで私はモデル動物であるマウスを用いて、精液凝固タンパク質が decapacitation factor として精子の受精能を調節しているか否かについて *in vitro* および *in vivo* の観点から研究を行い、その作用機構について検討を行った。

1. マウスにおける decapacitation factor の同定

マウスにおける精液凝固に関わるタンパク質は、交尾時に形成される膣栓の主要構成因子である分子量約 40kDa の seminal vesicle secretion, protein2 (SVS2)である。この SVS2 およびヒト SEMG の共通性を調べたところ、精漿/精嚢腺の主要なタンパク質であること、N 末側 55 アミノ酸において 55%の相同性があること、リジン含量が多く強塩基性タンパク質であることなどが明らかとなった。

そこでこの膣栓形成タンパク質 SVS2 が *in vivo* において精子と相互作用し得るか否かについて検討した。交尾後の雌生殖道内液を回収し、抗 SVS2 抗体によるウエスタンブロットを行ったところ、SVS2 の一部は交尾時に断片化されて射出精子とともに子宮内へ侵入すること、受精の場である卵管内ではほとんど検出されないことが明らかとなった(図 1)。またデンシトメトリー解析により子宮内の SVS2 の濃度を算出したところ約 25 μ M であった。

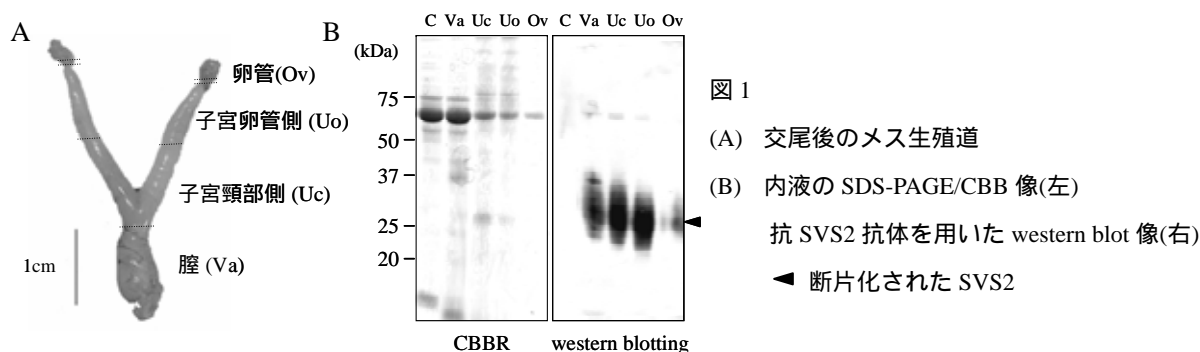


図 1
(A) 交尾後のメス生殖道
(B) 内液の SDS-PAGE/CBBR 像(左)
抗 SVS2 抗体を用いた western blot 像(右)
◄ 断片化された SVS2

次に SVS2 が精子の capacitation を阻害するか否かについて精巢上体精子を用いた *in vitro* の系で検討した。25 μ M SVS2 を含む培地でインキュベートした精子は capacitation のパラメーターであるタンパク質のチロシンリン酸化および先体反応を誘起できずに卵へ侵入できなかった(図 2)。さらに、交尾後の雌生殖道内から回収した射出精子を用いて *in vivo* での capacitation の状態を調べたところ、SVS2 が存在する子宮内に存在した精子は capacitation していないのに対して、SVS2 の存在していない卵管内の精子は capacitation していた。

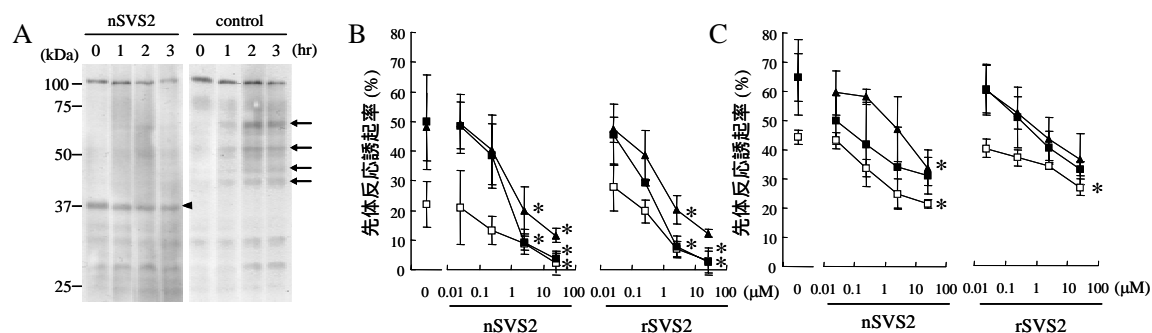


図 2 SVS2 が精子の capacitation に及ぼす影響 nSVS2; native SVS2, rSVS2; recombinant SVS2

(A) 精子のチロシンリン酸化の経時的変化 (◀ 増加したリン酸化チロシン, ◄ SVS2)

(B) 3h インキュベートした精子の先体反応誘起率 (■イオノマイシン, ▲プロジェステロン, □コントロール)

(C) 既に capacitation を誘起した精子に SVS2 処理した時の先体反応誘起率

* t-test (p<0.01)

これら射出精子における SVS2 の結合状態を免疫染色により調べた結果 ,子宮の頸部側に存在した精子の約 6 割において SVS2 は頭部後半に ,子宮の卵管側では約 7 割の精子において頭部赤道部分にバンド状に結合している様子が見られ ,卵管内では約 8 割の精子において SVS2 は結合が見られなかった(図 3) .

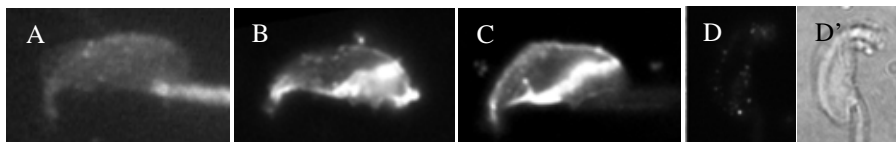


図 3 メス生殖道内から回収した精子における SVS2 の結合パターン
(A) 膣 , (B) 子宮頸部側 , (C) 子宮卵管側 , (D) 卵管 , (D') D の明視野

2. 精子における SVS2 受容体の解析

近年 ,精子 capacitation 時にラフトと呼ばれる膜微小ドメインが情報伝達の間として関与している可能性が考えられている .ラフトの構成分子であるガングリオシド GM1 は精子頭部後半に局在することが既に報告されており ,これは SVS2 の結合パターンと酷似している .実際に GM1 を特異的に認識する cholera toxin subunit B (CTB)を用いて精巣上体精子を染色すると頭部後半にシグナルが見られ ,交尾後の雌生殖道内に存在した射出精子においても SVS2 の結合パターン変化と同様に子宮の頸部側では頭部後半に ,卵管側では頭部赤道部分にバンド状に見られ ,卵管内に存在した精子では検出されなかった(図 4) .この結果から ,SVS2 受容体は精子ラフト上に存在すると予想される .

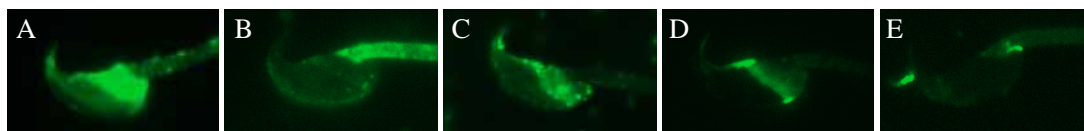


図 4 FITC-CTB で染色した精子 (A) 精巣上体精子 , (B)-(E) 射出精子 ;
(B) 膣 , (C) 子宮頸部側 , (D) 子宮卵管側 , (E) 卵管

そこで FITC-CTB を用いて精子ラフトと SVS2 の二重染色を試みた .その結果 ,精子頭部後半部分に見られる CTB シグナルは SVS2 で前処理しておくと同様に観察されず ,CTB で前処理しておいた精子では SVS2 が結合しないことが分かった(図 5) .この結果は SVS2 と CTB は競合する ,すなわち SVS2 は GM1 を介して精子に結合していることを示唆している .

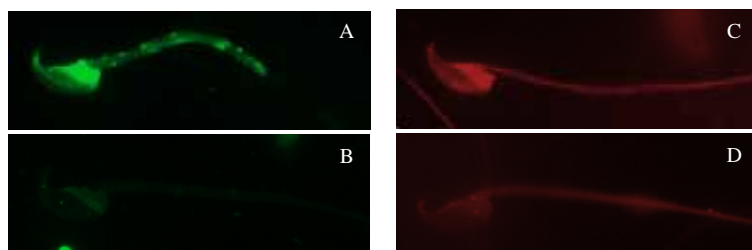


図 5 CTB と SVS2 は精子膜上で競合する
(A) FITC-CTB のみで処理した精子
(B) SVS2 で前処理した精子
(C) Alexa594-SVS2 のみで処理した精子
(D) CTB で前処理した精子

次に GM1 と SVS2 の分子間相互作用を blotting overlay アッセイおよび quartz crystal microbalance アッセイによって調べた .その結果 ,GM1 はSVS2 特異的に結合すること ,SVS2 と GM1 の結合はミカエリス・メンテンの式に従い Kd 値 $4.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ であることが明らかとなった .また , GM1 が持つ糖鎖末端のシアル酸を欠失している asialo GM1 は SVS2 とほとんど相互作用しなかった .このことから GM1 と SVS2 の結合にはシアル酸が重要な働きを持つことが分かった .次に糖鎖末端のシアル酸の結合様式が SVS2 との相互作用に関係するかどうかを検討するために , α 2-3 結合型のシアル酸を認識する MAA , α 2-6 結合型のシアル酸を認識する SNA のレクチン 2 種を用いて精子膜上で競合実験を行った .その結果 ,SVS2 は MAA による精子の染色を著しく抑制したことから SVS2 は α 2-3 結合型シアル酸を持つ GM1 に結合していることが分かった .

さらに SVS2 による精子の decapacitation は GM1 の添加によって阻害されるか否かについて検討を行った .その結果 , GM1 は濃度依存的に SVS2 による精子 capacitation 抑制作用を解除したが , asialo GM1 では解除できなかった(図 6) .

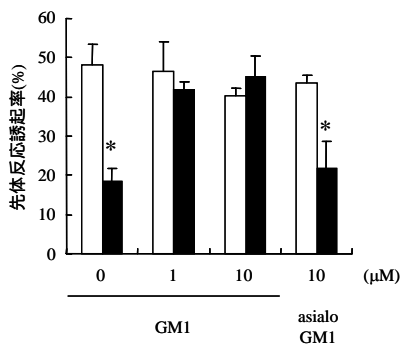


図 6 GM1 による SVS2 の抑制作用のレスキュー実験
(□ コントロール , ■ SVS2)
* t-test (p<0.01)

まとめ

マウス膣栓形成タンパク質 SVS2 は交尾時に精子とともに子宮内へと侵入し , 精子頭部の受容体と考えられる GM1 に結合する(下図) . また , SVS2 は精子 GM1 の働きを制御することで精子 capacitation を制御し , 子宮内において decapacitation factor として働いていると考えられる . 同じ分子ファミリーであるマウス SVS2 とヒト SEMG が同様に精子の受精能を抑制することから , 精液凝固タンパク質ファミリーが種間に共通する decapacitation factor である可能性がある .

